

## 発がん感受性・抵抗性ならびに高発がん家系に関する研究

主任研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部長

DNA修復酵素遺伝子であるOGG1の遺伝的多型による活性の違いが喫煙者における肺扁平上皮がんへの感受性を規定する一因であることを明らかにした。発がん物質代謝酵素遺伝子であるCYP2A6の遺伝的多型により喫煙者における肺扁平上皮がんおよび小細胞がんに対するリスクが異なることを明らかにした。家族性胃がんの国際共同研究組織(International Gastric Cancer Linkage Consortium)の第1回国際会議に出席して家族性胃がんの診断基準を作製し、この基準に従って、我が国の胃がん患者には家族性Diffuse型胃がんが約3%、家族性Intestinal型胃がんが約0.07%存在すると算出した。MNGによる胃発がん感受性に関与する4つの遺伝子の存在領域を狭めるため、新たな発がん実験、コンジェニックラットの作成を進めた。滑膜肉腫にみられる染色体転座t(x;18)(p11.2;q11.2)より生じたSYT-SSX遺伝子産物のHLA-A24拘束性抗原ペプチドを同定した。第二回家族性腫瘍カウンセラー養成セミナーを開催した。

## 分担研究者

- |          |             |     |
|----------|-------------|-----|
| 1. 横田 淳  | 国立がんセンター研究所 | 部長  |
| 2. 吉村公雄  | 国立がんセンター研究所 | 研究員 |
| 3. 宇都宮譲二 | 順心会津名病院     | 院長  |
| 4. 牛島俊和  | 国立がんセンター研究所 | 部長  |
| 5. 鎌滝哲也  | 北海道大学薬学部    | 教授  |
| 6. 佐藤昇志  | 札幌医科大学      | 教授  |

## A. 研究目的

臨床疫学的研究によって見いだされた遺伝性腫瘍や高発がん家系の要因に関する研究は、この十余年の間にがん抑制遺伝子研究を中心に急速に進み、最近ではDNA損傷の修復異常との関連性もわかってきた。その結果、遺伝性腫瘍の原因遺伝子は現在までにほとんどすべてが同定され、がん遺伝子、がん抑制遺伝子、DNA修復酵素遺伝子が発がん感受性に重要な役割を担っていることがわかっている。しかし、これらの遺伝子異常によって「がんになり易い体質」として診断できる人は全がん患者の5%にも満たない。特に、世界的にも増加傾向にある肺がんや我が国で最も多い胃がんなどに関しては、その環境要因に関する研究に比べて遺伝的要因に関する研究が遅れており、発がん感受性を規定する遺伝子はほとんどわかっていない。本研究の目的は、肺がん・胃がんを中心に、発がん感受性を規定する新しい遺伝子を単離・同定することである。特に肺がん

の発生には家族集積性がないことがこれまでの本研究で明らかになっているので、肺がんでは、DNA損傷の修復に関与する遺伝子、発がん物質の代謝に関わる遺伝子の遺伝的多型と発がんリスクに関する研究を進めた。また、胃がんでは最近、E-カドヘリンの胚細胞変異が家族性diffuse型胃がんの原因遺伝子として同定されたが、我が国の家族性胃がんの主要因であるかは明らかでない。そこで、E-カドヘリンを中心に家族性胃がんの要因を究明した。さらに、第1回家族性胃がんの国際会議に出席し、その国際的な診断基準を作成するとともに、その基準に従って我が国の胃がん家族内集積性の特徴を再検討した。また、ラットの胃発がん感受性を規定する遺伝子、胃がん抗原となりうる遺伝子などの単離・同定を進めており、それらの遺伝子が同定されれば、それらの遺伝子異常あるいは多型と発がん感受性の関連性も追及する予定である。一方、我が国では原因遺伝子の同定されている高発がん家系についてもその実態が十分には把握されてなく、その診断法や支援体制も確立していない。そこで、本研究ではがん情報のデータベース化によって我が国における高発がん家系の特徴を整理している。そのひとつは大腸がん研究会との共同作業による遺伝性非腺腫性大腸がんの調査・研究である。できる限り遺伝子診断も積極的に進め、遺伝子異常と発がんの関連性を明確にすることを目指している。もうひとつは、宇都宮を中

心としたカウンセラーの養成と家族性腫瘍研究の地域拠点作りである。以下に、個々の課題に関する研究方法と研究成果を列記する。

## B. 研究方法

### (1) DNA 損傷修復酵素の活性と発がん感受性に関する研究

これまでの本研究で、8-ヒドロキシグアニンによって誘発される遺伝子の突然変異抑制に関与する OGG1 遺伝子を単離し、遺伝的多型による酵素活性の個人差を見出している。今年度は、この多型による酵素活性の個体差が肺がんへのリスクを規定する要因になりうるか、症例対象研究法にて検証した。また、OGG1 蛋白質に対する抗体を作製し、ヒトのがん細胞、正常細胞における発現状態を蛋白質および mRNA レベルで検討した。

### (2) 発がん物質代謝酵素の活性と発がん感受性に関する研究

4-メチルニトロソアミノ-1-(3-ピリジル)-1-ブタノン (NNK) などたばこ煙中のがん原性ニトロソアミン類は、CYP2A6 によって効率的に発がん物質へと変換される。従って本酵素活性が遺伝的に欠損しているヒトでは、がん原物質の代謝的活性化が少なく、発がんリスクが低いと予想される。本年度は CYP2A6 の遺伝的多型と肺がんリスクとの関連性を明確にするために、症例対象研究を実施した。被験者の血液より、ゲノム DNA を抽出し、PCR-RFLP 法を用いて、野性型/野性型、野性型/置換型、置換型/置換型、野性型/欠損型、置換型/欠損型および欠損型/欠損型の判別を行った。

### (3) がん情報のデータベース化及び家系調査による高発がん家系の把握

家族性胃がんの国際共同研究組織 International Gastric Cancer Linkage Consortium (IGCLC) の第 1 回国際会議に出席し、家族性胃がんの診断基準及びその支援体制に関するガイドラインを作成した。この基準に基づいて、国立がんセンター中央病院において 1995 年 1 月から 1997 年 12 月までの 3 年間に胃がんの手術を受けた全患者（重複除き 877 名）の診療録から、家族歴、病理組織所見を抽出し、家族性胃がんの頻度を算出した。また、1995 年までに国立がんセンター中央病院で治療を受けた胃がん患者のパラフィン包埋組織標本から DNA を抽出し、E

-カドヘリンあるいは p53 の胚細胞変異、遺伝子不安定性があるか、PCR 法を用いて検討した。

大腸癌研究会の HNPCC 登録・遺伝子解析研究班と共同で、大腸癌研究会の会員施設を対象に年次調査を行い、HNPCC アムステルダム基準に合致する症例の家系図と病歴や遺伝子変異などの情報を収集した。

### (4) 高発がん家系に対する支援体制の整備

厚生省助成金「がんの家族内集積性に関する研究」班との協同で第 2 回家族性腫瘍カウンセラー (CSR) 養成セミナーを開催した。家系管理システムとして GDS 社 Progeny の日本語版を作成し、インターネット会議システム First Class Internet Server (FCIS) を導入した。

### (5) 実験動物モデルを利用した発がん感受性遺伝子の探索

MNNG による胃発がんに対し、ACI/N ラット (ACI) は高感受性、BUF/Nac ラット (BUF) は抵抗性を示す。そこで、雌 ACI に雄 (ACI×BUF)F1 を交配して ACI×(ACI×BUF)F1 戻し交雑ラットを作成し、83mg/IMNNG を飲水中に混じて 40 週齢まで投与し、80 週齢まで飼育・屠殺した。全ての個体について、胃がんの有無、及び、胃がんを認めた場合には、分化度、直径、進達度を検索した。遺伝子型の解析は 161 個の座位について多型を決定した。連鎖地図は MAPMAKER/EXP ソフトウェアにより作成し、胃がん感受性に関する表現形質との連鎖解析は MAPMAKER/QTL ソフトウェアにより行った。候補遺伝子については、ラットとヒトの比較地図を利用し、胃がん感受性遺伝子の各座位に相当するヒト染色体領域を検索した。細胞増殖シグナル、胃粘膜の炎症や修復などに関与する遺伝子について、イントロンまたはタンパク質翻訳領域の PCR-SSCP 解析により、ACI と BUF 間での多型を検索した。

### (6) がん細胞の抗原性及び生体の防御機構と発がん感受性に関する研究

$5 \times 10^{10}$  の HST-2 細胞を 0.1% トリフロロ酢酸処理し、Sephadex G25、逆相 HPLC、エドマン分解法を用いて natural antigenic peptide を決定した。この peptide の遺伝子クローニングを degenerated primers を用いて行った。

cancer-associated retinopathy (CAR) 患者の良好予後の分子機序を明らかにするため、正常網膜組

織とがん細胞に発現する recoverin 蛋白質を標的抗原と予想し、HLA-A24 に結合する合成ペプチドを A24 の結合モチーフを参考に作製し、CTL エピトープを決定した。CTL 前駆細胞を CAR(+) がん患者、CAR(-) がん患者、健常者について比較した。

口腔扁平上皮がん OSC-20 の HLA-DR8 拘束性抗原ペプチドを、酸抽出法、逆相 HPCC、mass-spectrometry にて決定した。肺がん LHK-2、膝がん PUN、骨肉腫 OS2000、咽頭扁平上皮がん STK-1 の HLA クラス I 提示分子を決定し、抗原遺伝子のクローニングを行った。

(倫理面への配慮)

症例対象研究は、各被験者に十分な説明を行ない、同意を得ている。胃がんの解析は 1995 年以前の症例なので匿名化してパラフィン包埋組織標本を用いた。いずれの研究も集団として解析したので個人への結果の通知は行っていない。動物実験は指針に従い、愛護的な取り扱いを行った。

### C. 研究成果

(1) DNA 損傷修復酵素の活性と発がん感受性に関する研究

我々はこれまでの本研究で、新規の DNA 修復酵素遺伝子 OGG1 を単離し、この遺伝子には遺伝的な多型によって Ser326 型と Cys326 型があり、その 8-ヒドロキシグアニンに対する修復酵素活性は Ser326 型の方が Cys326 型より高いことを明らかにしている。そこで、今年度は肺がん患者を対象として発がんリスクに関する症例対象研究を行なった。その結果、年齢と喫煙歴を考慮した上で、Cys326 型をホモに持つヒトは肺の扁平上皮がんに対するリスクが他の集団に対して約 3 倍高いことが明らかになった。この結果は、この遺伝子産物の酵素活性が低い人は喫煙によって誘発される遺伝子変異を修復する能力が低いために肺がんになるリスクが高いということを示唆している。

OGG1 遺伝子は alternative splicing により 8 種類の mRNA を発現していることが知られていたが、RT-PCR 解析により新たに 5 種類の転写産物があることを明らかになった。特に、13 種類の産物のうち 1a 型アイソフォームのみが核移行シグナルと DNA 結合配列を持ち、染色体 DNA の修復に関与していることが示唆された。OGG1 遺伝子の機能を蛋

白質レベルで解析するために、OGG1 蛋白質に対する抗体を 2 種類作製し、mRNA の発現と比較解析した結果、1a 型アイソフォームは、OGG1 遺伝子に変異のある肺がん細胞株以外では調べたすべての細胞で同程度発現していることが明らかになった。即ち、OGG1 遺伝子はがん細胞においても正常細胞においても、酸化傷害である 8-ヒドロキシグアニンを修復している主要な酵素であることが示唆された。

(2) 発がん物質代謝酵素の活性と発がん感受性に関する研究

喫煙者において肺がん患者 (363 名) と非肺がん患者 (440 名) の CYP2A6 遺伝子型の分布は有意 ( $P=0.004$ ) に異なっており、CYP2A6 の遺伝的多型が肺がんリスクと関連していることが示された。全欠損型多型をホモ接合体で有するヒトの頻度は、肺がん患者 (1.6%) で、非肺がん患者 (5.5%) に比べて明らかに低かった。オッズ比を算出したところ、野生型アリルをホモ接合体で有するヒトのオッズ比を 1.00 とした場合、全欠損型多型をホモ接合体で有するヒトでは、0.17 と有意 (95% 信頼区間 0.06-0.47) に低下していた。一方、非喫煙者において肺がん患者 (149 名) と非肺がん患者 (161 名) の CYP2A6 遺伝子型の分布には有意な差は認められなかった ( $P=0.452$ )。また、扁平上皮がん罹患している患者と、非肺がん患者の CYP2A6 遺伝子型の分布が、有意 ( $P=0.029$ ) に異なっており、CYP2A6 の遺伝的多型と扁平上皮がんのリスクが関連していることが示された。特に、全欠損型多型をホモ接合体で有するヒトは、扁平上皮がん患者 86 名中 1 人もいなかった。

(3) がん情報のデータベース化及び家系調査による高発がん家系の把握

1999 年 6 月に英国のケンブリッジで開催された第 1 回の家族性胃がんの国際会議に出席し、家族性胃がんの国際的な診断基準を作成した。その特徴は、集積している胃がんの組織型により diffuse 型と intestinal 型に分類したこと、胃がん発生頻度の高い国と低い国で異なる診断基準を設けたこと、HNPCC/APC/Li-Fraumeni 症候群等を除くという但し書きを付けたことである。また、本会議に参加した外科医等の臨床研究者を中心にして、E-カドヘリンの胚細胞変異陽性患者に対する胃の予防的摘出手術の適応等についても議論され、患者の支援体制

に関するガイドラインも作成された。その基準では、発端者も含め2人以上のdiffuse型胃癌患者が第2度以内の近親者に存在し、少なくとも1人は50歳未満で診断されている場合、または、発端者を含めて3人以上のdiffuse型胃癌患者が第2度以内の近親者に存在する場合に、家族性diffuse型胃癌と診断される。また、(1)家系内に少なくとも3人のintestinal型胃癌患者がいて、そのうちの1人は他の2人の第1度近親者である、(2)少なくとも連続する2世代にわたってintestinal型胃癌患者がいる、(3)intestinal型胃癌患者の少なくとも1人は50歳未満で診断されている、の3項目を満たす場合に家族性intestinal型胃癌と診断される。

この基準に基づいて国立がんセンター中央病院において1995年1月から1997年12月までの3年間に胃癌の手術を受けた877名の患者を解析し、発端者が胃癌を発生する際、その組織系が家系内近親者の組織系とは独立であるという仮定をおくと、家族性diffuse型胃癌は全家系の約3%に、また、家族性intestinal型胃癌は全家系の約0.07%存在すると予測された。うち29家系を再調査し、実際に家族性diffuse胃癌1家系が発見された。しかし、発端者以外の胃癌患者の組織型が明らかになったのは1/6程度に過ぎず、発端者以外の情報を得ることは容易ではないことがわかった。組織型不明の原因としては、発端者以外の胃癌患者の情報が曖昧なこと、発端者以外の家系構成員の協力が得られないこと、他院の協力が得られないこと、検査が施行されていなかったこと、診療録が破棄されていたことなどであった。

また、1995年までの胃癌患者3632名の病歴を調べたところ、31例(0.9%)に胃癌の家族内集積を認めた。これらの家系では胃癌のみが集積していることが多く、HNPCCやLi-Fraumeni症候群に合致する症例は全くなかった。病理学的には分化型の腺がんが多く、未分化型の腺がんが集積している家系は検出できなかった。患者検体からDNAが採取できた13例の遺伝子解析の結果、1例にE-カドヘリンの胚細胞変異が、3例にマイクロサテライトの遺伝子不安定性が検出され、p53変異は1例も検出されなかった。この結果から、我が国における胃癌家族集積の要因はこれらの遺伝子以外にあることが示唆された。

今年度も新たなHNPCC家系が発見され、現在までに203家系が登録された。大腸癌研究会と共同でHNPCCの登録を行うことで、データベースの維持、管理体制が確立し、円滑な運営によるHNPCC全国登録が可能となった。

#### (4) 高発がん家系に対する支援体制の整備

家族性腫瘍カウンセラー養成セミナーの結果、FAP、HNPCC、P-J、乳がん、胃癌、VHL、MEN1、MEN2、家族性睪臓がん、家族性乳がん、等に関して、1148例(733家系)が調査対象となり、602例(382家系)がカウンセリングの対象で、836例(439家系)で遺伝子解析が既に行われていることが判明した。

遺伝情報システムとしては、日本語化Progenyを用いて150家系を入力し、機能性、安全性に満足し得るレベルに到達したので、近くJProgeny2000として完成する。FCISは頻回のグループ討論(倫理委員会等)に有用で、機密性高く家系情報の移送に適するものであることが分かった。

#### (5) 実験動物モデルを利用した発がん感受性遺伝子の探索

胃癌の発生に関与する座位として、ラット15番染色体D15Rat102近傍にGastric Cancer Susceptibility Gene 1(Gcs1)を、LOD score 3.8でマップした。胃癌の分化度との連鎖解析から、主にadenomaからcarcinomaへのコンバージョンに関与する遺伝子であることが判明した。更に、4番染色体Ampp近傍及び3番染色体D3Rat55近傍にGastric Cancer Resistance Gene 1(Gcr1)及びGcr2を、LOD score 2.8及び2.7で各々マップした。両座位とも、BUF由来のアレルが、優性に胃癌発生を抑制する効果を示した。胃癌の大きさと進達度に関与する座位として、16番染色体D16Rat17近傍にGcr3を、LOD score 2.2でマップした。BUF由来のアレルが、優性に、胃癌の大きさを平均13mm、進達度も進達度分類でほぼ1段階、抑制した。

Gcr1の候補遺伝子として、染色体比較地図から、Msh2遺伝子が存在する可能性を考えた。マップしたところ、Gcr1とは別の6番染色体にマップされた。Gcr2の候補遺伝子として、Cyclooxygenase 1(Cox1)遺伝子をマップした。胃癌発生との連鎖がGcr2のピークよりも弱いこと、タンパク質翻訳領域にはACIとBUFとの間の多型がないことから、

Gcr2ではないと考えた。Gcs1領域の候補遺伝子として、endothelin receptor type B 遺伝子を考えているが、多型は、現在まで、見いだされていない。

上記の Gcs1, Gcr1, Gcr2, Gcr3 の存在領域を絞り込むため、雄戻し交雑ラット164匹、及び、196匹から選抜した62匹、の合計226匹を用いて発がん実験を行った。更に、ACI由来の Gcs1, Gcr1, Gcr2, Gcr3 の各領域をそれぞれ、BUFの遺伝的背景に導入したコンジェニックラットを4系統、BUF由来の Gcs1 領域をACIに導入したコンジェニックラットを1系統、作成した。

(6) がん細胞の抗原性及び生体の防御機構と発がん感受性に関する研究

ヒト胃印環細胞がん(HST-2)でHLA-A31拘束性抗原ペプチド(YSWMDISCWI)F4.2を決定した。また、このペプチドをコードする遺伝子候補C98を分離した。この遺伝子は新規の遺伝子であり、機能は不明である。

網膜とがん組織に発現するrecoverin蛋白質が発がん患者にみるcancer-associated retinopathy (CAR)の原因抗原蛋白質と考えられており、CARの患者は生命予後が良好なことも知られている。本研究でHLA-A24拘束性のR49ペプチド(QFASIYAKF)などrecoverin由来の3つのペプチドがCTLの標的となることが示された。これらの前駆細胞の頻度をみるとCAR(+)が発がん患者で最も高く、以下CAR(-)が発がん患者、健常者の順であった。この結果は、CAR(+)患者の良好な生命予後と関連し、しかもがん細胞で発現が増強していることを示唆している。

口腔がんOSC-20でCD4T細胞の標的抗原がHLA-DR8拘束性 $\alpha$ エノラーゼ由来の16アミノ酸よりなるペプチドであることが示唆された。肺がん(LHK-2)、膵がん(PUN)、骨肉腫(OS2000)、咽頭扁平上皮がん(STK-1)などで自己CTLクローンを得た。提示分子はLHK-2がHLA-A24、PUNがHLA-A26と決定された。この両者については現在抗原遺伝子をクローニング中である。

#### D. 考察

(1) DNA損傷修復酵素の活性と発がん感受性に関する研究

肺がんに関しては、煙草に代表されるように環境

要因が重要視されているが、そのような発がん物質を代謝する酵素活性やDNA修復酵素活性に個体差があり、その違いによって肺がん感受性も異なっていることが予測されている。そこでDNA修復酵素遺伝子に着目し、新規遺伝子の単離、遺伝的多型の探索、多型による活性の差の検討を進めてきた。その結果、OGG1遺伝子の産物の活性には個体差があり、その差によって肺がんに対するリスクが異なっていることを見出せたのは、本研究の特記すべき成果と考えている。しかし、このような多因子のひとつと考えられるリスクファクターは他の因子も考慮に入れて検討する必要がある。今後は、他の集団を用いた症例対象研究によりこの結果を確認するとともに、他のリスクファクターを考慮して、肺がんへのリスクが遺伝子多型の解析からどこまで推定できるか明らかにしていきたい。

(2) 発がん物質代謝酵素の活性と発がん感受性に関する研究

喫煙者においては、CYP2A6遺伝子型の分布が肺がん患者と非肺がん患者間で有意に異なっていたが、非喫煙者においては有意ではなかった。CYP2A6がたばこ煙中のがん原物質の代謝的活性化全体に対する寄与が大きいことを示唆する結果であったが、今回の非喫煙者は喫煙者に比べて検体数が少なく、男女比も喫煙者群とは異なっていたことから、今後さらに追試が必要である。組織型については、扁平上皮がんのみならず、やはり喫煙の影響が言われている小細胞肺がんにおいてもそのリスクとCYP2A6遺伝的多型が関連する可能性が示唆された。この結果についても追試して確認していきたい。

(3) がん情報のデータベース化及び家系調査による高発がん家系の把握

胃がんの発生に関しては、環境要因の重要性は指摘されているものの、遺伝的な要因に関しては最近までほとんど不明であった。しかし、一昨年、ニュージーランドのマオリ族の胃がん集積家系でE-カドヘリンに胚細胞変異があることが報告されたので、我が国における胃がんの発生に関してどの程度この変異が関与しているかを明らかにすることを試みた。本研究によって我が国の胃がんの発生にも家族集積性があり、遺伝的な要因が関与している可能性が強く示された。しかし、必ずしもdiffuse型胃がんが集積しているわけではなく、E-カドヘリンの胚細胞

変異も検出されないことから、この集積には他の遺伝的要因が関与していることが示唆される。今後は他の要因を突き止めるため、さらに多くの家系を集め、連鎖解析を含めた包括的な研究が必要である。また、国際的な診断基準に従って、我が国の胃癌集積状況の特徴や頻度を把握することも必要である。

HNPCC に関しては、年々登録家系は増えているものの、登録情報の質は様々である。今後も本調査を継続していく必要があるが、登録情報の質も高めるべく登録支援体制をさらに整備する必要がある。

#### (4) 高発がん家系に対する支援体制の整備

本研究では、家族性腫瘍研究の一環として、患者・家族の支援体制の整備を目標にしたがん遺伝カウンセラーの養成、また、遺伝子/家系情報の伝達、管理、活用技術のレベル向上を目指した研究を進めてきた。即ち、第2回家族性腫瘍カウンセラー養成セミナーの開催と遺伝子/形質相関データベースの構築である。本研究のさらなる進展によって、我が国の家族性腫瘍の特徴が明らかにされ、また、その発がん機構に対する国民の理解が深まり、患者や家族に対する支援体制がさらに充実していくことが期待される。

#### (5) 実験動物モデルを利用した発がん感受性遺伝子の探索

単一の優性の抵抗性遺伝子によると推定されていたBUFの胃癌抵抗性に、合計4個の遺伝子(感受性遺伝子 Gcs1、抵抗性遺伝子 Gcr1, Gcr2, Gcr3)が関与していることが判明した。Gcs1, Gcr1, Gcr2 は主に胃癌の発生に関与し、Gcr3は大きさや進達度など胃癌の進展に関与する。この結果から、ヒトの胃癌の家族内集積でも、更に複数の遺伝子が複雑に関与していることが示唆され、今後、家系分析や single nucleotide polymorphism による系統的解析を行う際に、参考になる知見である。

今後の遺伝子クローニングを行うための準備は、順調に進行している。新たに発がん実験を行った226匹については、現在、表現形質及び遺伝子型の決定を進めている。Gcr1及びGcr2については、有効個体数は360匹(164+194)と考えられ、存在領域を1-2 cM程度まで絞り込む予定である。また、Gcs1については、有効個体数は226匹(164+62)と考えられ、2-3 cM程度まで絞り込む予定である。また、コンジェニックラットが完成すれば、各座位を

持つ系統の交配により、それぞれの座位の影響力や相互作用の評価が可能となると考えられる。

#### (6) がん細胞の抗原性及び生体の防御機構と発がん感受性に関する研究

本研究で得られつつある成果はいずれもがんワクチンとして実用化の可能性をもっている。F4.2はHST-2以外の胃癌にも発現し、しかもA31(+)胃癌患者の少なくとも30-40%からF4.2特異的CTLの誘導可能であった。CARにおけるリカバリン由来ペプチドの同定にも成功したが、これは paraneoplastic syndrome の良好予後の分子機序を説明できるという点においても重要な研究結果である。また、今回我々はメラノーマ以外ではじめてCD4エピトープを決定した。 $\alpha$ -エノラーゼはがん細胞に多く発現するのでCD4ワクチンの可能性がある。ただし、正常細胞にも微量に発現し、ワクチン実用化に向けてはより詳細な解析が必要である。肺がん、膵がんの自家がん-CTLのペアを樹立できた意義も大きい。特にLHK-2はHLA-A24の提示分子であり、抗原が決まれば、多くの肺がん患者に有効ながんワクチンが開発できる可能性がある。

#### E. 結論

肺がんは常染色体優性に遺伝して発生するような家系は少ないが、既知の発がん物質代謝酵素遺伝子に加えてCYP2A6の遺伝的多型が肺がんへのリスクを規定していることが明らかになった。また、DNA修復酵素遺伝子としてOGG1の遺伝的多型が肺がんの感受性を規定している可能性が示された。

我が国における胃癌発生には家族集積性があるが、その遺伝的要因に関しては、既知の遺伝子異常では説明できず、未知の要因を探索する包括的な研究が必要である。

MNNGによるラット胃癌感受性に関与する遺伝子4個をマップした。うち3個は、胃癌の発生に関与し、残り1個は胃癌の進展に関与した。標的遺伝子を単離するための戻し交雑ラットを用いた発がん実験を終了し、コンジェニックラットの作製をN4またはN5世代まで進めた。

HLA-A31が提示する胃癌抗原ペプチドF4.2を同定した。HLA-A24拘束性LHK-2肺がん、A-26拘束性PUN膵がんを樹立し、抗原遺伝子をクローニング中である。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Tani, M., Shimizu, K., Kawahara, C., Kohno, T., Ishimoto, O., Ikawa, S. and Yokota, J. Mutation and expression of the p51 gene in human lung cancer. *Neoplasia*, 1:71-79, 1999.
- 2) Shinmura, K., Kohno, T., Takahashi, M., Sasaki, A., Ochiai, A., Guilford, P., Hunter, A., Reeve, A. E., Sugimura, H., Yamaguchi, N. and Yokota, J. Familial gastric cancer: clinicopathological characteristics, RER phenotype, and germ-line p53 and E-cadherin mutations. *Carcinogenesis*, 20:1127-1131, 1999.
- 3) Kohno, T. and Yokota, J. How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis? *Carcinogenesis*, 20:1403-1410, 1999.
- 4) Kodera, T., Kohno, T., Takakura, S., Morishita, K., Hamaguchi, H., Hayashi, Y., Sasaki, T. and Yokota, J. Microsatellite instability in lymphoid leukemia and lymphoma cell lines but not in myeloid leukemia cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, 26:267-269, 1999.
- 5) Sugimura, H., Kohno, T., Wakai, K., Nagura, K., Genka, K., Igarashi, H., Morris, B., Baba, S., Ohno, Y., Gao, C.-M., Li, Z.-Y., Wang, J.-D., Takezaki, T., Tajima, K., Varga, T., Sawaguchi, T., Lum, J. K., Martinson, J. J., Tsugane, S., Iwamasa, T., Shinmura, K. and Yokota, J. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 8:669-674, 1999.
- 6) Kohno, T., Takakura, S., Yamada, T., Okamoto, A., Tanaka, T. and Yokota, J. Alterations of the PPP1R3 gene in human cancer. *Cancer Res.*, 59:4170-4174, 1999.
- 7) Caldas, C., Carneiro, F., Lynch, H. T., Yokota, J., Wiesner, G. L., Powell, S., Lewis, F. R., Huntsman, D. G., Pharoah, P., Jankowski, J. A., MacLeod, P., Vogelsang, H., Keller, G., Park, K. G. M., Richards, F. M., Maher, E. R., Gayther, S., Oliveira, C., Grehan, N., Wight, D., Seruca, R., Roviello, F., Ponder, B. A. J. and Jackson, C. E. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J. Mol. Genet.*, 36:873-880, 1999.
- 8) Hamada, K., Kohno, T., Takahashi, M., Yamazaki, M., Tashiro, H., Sugawara, C., Ohwada, S., Sekido, Y., Minna, J. and Yokota, J. Two regions of homozygous deletion clusters at chromosome band 9p21 in human lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 27:308-318, 2000.
- 9) Inoue, K., Kohno, T., Takakura, S., Hayashi, Y., Mizoguchi, H. and Yokota, J. Frequent microsatellite instability and BAX mutations in T cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leukemia Res.*, in press, 2000.
- 10) Takakura, S., Kohno, T., Shimizu, K., Ohwada, S., Okamoto, A. and Yokota, J. Somatic mutations and genetic polymorphisms of the PPP1R3 gene in patients with several types of cancers. *Oncogene*, 19:836-840, 2000.
- 11) Shinmura, K., Kohno, T., Takeuchi-Sasaki, M., Maeda, M., Segawa, T., Kamo, T., Sugimura, H. and Yokota, J. Expression of the OGG1-type 1a (nuclear form) protein in cancerous and non-cancerous human cells. *Int. J. Oncol.*, 16:701-707, 2000.
- 12) Miyaki, M., Iijima, T., Konishi, M., Sakai, K., Ishii, A., Yasuno, M., Hishima, T., Koike, M., Shitara, N., Iwama, T., Utsunomiya, J., Kuroki, T. and Mori, T. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene*, 18:3098-3103, 1999.
- 13) Utsunomiya, J. and Gondo, N. Surgical Management of Familial Adenomatous Polyposis. In: *Familial Cancer and Prevention*. Utsunomiya, J., Mulvihill, J. J., Weber, W., eds. Wiley-Liss, New

- York, pp153-162, 1999.
- 14) Hirayama, Y., Ushijima, T., Kuramoto, T., Kitano, M., Sugimura, T. and Nagao, M. Linkage mapping of the rat Msh2 DNA mismatch repair gene on chromosome 6. *Exp. Anim.*, 48:63-64, 1999.
  - 15) Suzui, M., Ushijima, T., Dashwood, R. H., Yoshimi, N., Sugimura, T., Mori, H. and Nagao, M. Frequent mutations in the rat  $\beta$ -catenin gene (Cttnb1) of ulcerative colitis-associated colon cancer induced by 1-hydroxyanthraquinone and methylazoacetate. *Mol. Carcinog.*, 24:232-237, 1999.
  - 16) Ushijima, T., Yamamoto, M., Suzui, M., Kuramoto, T., Yoshida, Y., Nomoto, T., Tatematsu, M., Sugimura, T. and Nagao, M. Chromosomal mapping of genes controlling development, histological grade, depth of invasion and size of rat stomach carcinomas. *Cancer Res.*, 60:1092-1096, 2000.
  - 17) Nunoya, K., Yokoi, T., Takahashi, Y., Kimura, K., Kinoshita, M. and Kamataki, T. Homologous unequal cross-over within the human CYP2A gene cluster as a mechanism for the deletion of entire CYP2A6 gene associated with the poor metabolizer phenotype. *J. Biochem.*, 126:402-407, 1999.
  - 18) Kamataki, T., Nunoya, K., Sakai, Y., Kushida, H. and Fujita, K. Genetic polymorphism of CYP2A6 in relation to cancer. *Mut. Res.*, 428:125-130, 1999.
  - 19) Chiba, M., Yokoi, T., Kosaka, Y., Chiba, K., Nakamura, H., Ishizaki, T., Yokota, J., Kinoshita, M., Sato, K., Inaba, M., Aoki, Y., Gonzalez, F. J. and Kamataki, T. Genetic polymorphism of CYP2D6 in Japanese population. *Pharmacogenetics*, 9:601-605, 1999.
  - 20) Miyamoto, M., Umetsu, Y., Akita, H., Sawamura, Y., Yokota, J., Kunitoh, H., Nemoto, N., Sato, K., Ariyoshi, N. and Kamataki, T. CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261:658-660, 1999.
  - 21) Chida, M., Yokoi, T., Fukui, T., Kinoshita, M., Yokota, J. and Kamataki, T. Detection of three genetic polymorphisms in the 5'-flanking region and intron of human CYP1A2 in the Japanese population. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90:899-902, 1999.
  - 22) Kikuchi, K. and Sato, N. Cell-mediated immunity to autologous cancer. Rationale of immunotherapy of human cancer with CTL. In "Recent Advances of Human Tumor Immunology and Immunotherapy" Gann Monogr. on Cancer Res., Eds. K. Kikuchi, B. van den Eynde and N. Sato, 48:3-14, 1999.
  - 23) Sato, N., Okada, Y., Suzuki, K., Sahara, H., Yasoshima, T., Hirohashi, Y., Nabeta, Y., Hirai, I., Torigoe, T., Takahashi, S., Takahashi, N., Sasaki, A., Suzuki, M., Hamuro, J., Ikeda, H., Wada, Y., Hirata, K. and Kikuchi, K. Natural antigenic peptides of gastric signet ring cell carcinomas. In "Recent Advances of Human Tumor Immunology and Immunotherapy" Gann Monogr. on Cancer Res., Eds. K. Kikuchi, B. van den Eynde and N. Sato, 48:31-41, 1999.
  - 24) Akazawa, T., Hirai, I., Hirohashi, Y., Kamiguchi, K., Sahara, H., Torigoe, T., Nagasawa, S., Tamura, Y. and Sato, N. A novel negative regulator molecule, Cho-1, is involved in the cytotoxicity by human natural killer cells but not in cytotoxic T lymphocytes. *Microbiol. Immunol.*, 43:285-291, 1999.
  - 25) Tsuruma, T., Yagihashi, A., Torigoe, T., Araya, J., Watanabe, N., Sato, N. and Hirata, K. Interleukin 10 reduces natural killer sensitivity of tumor cells by downregulating of NK target structure expression. *Cell. Immunol.*, 198: 103-110, 1999.
  - 26) Matsuura, A., Kinebuchi, M., Itoh, Y., Kasai, K., Yamada, K., Yoshida, M.C., Horie, M., Kikuchi, K. and Sato, N. Genomic organization and chromosome location of the



- rat CD3  $\zeta$  locus (Cd3z). *Cytogenet. Cell Genet.*, 85:301-305, 1999.
- 27) Suzuki, K., Sahara, H., Okada, Y., Yasoshima, T., Hirohashi, Y., Nabaeta, Y., Hirai, I., Torigoe, T., Takahashi, S., Matsuura, A., Takahashi, N., Sasaki, A., Suzuki, M., Hamuro, J., Ikeda, H., Wada, Y., Hirata, K., Kikuchi, K. and Sato, N. Identification of natural antigenic peptides of a human gastric signet ring cell carcinoma recognized by HLA-A31-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.*, 163:2783-2791, 1999.
- 28) Nabaeta, Y., Kawaguchi, S., Sato, Y., Wada, T., Yamashita, T. and Sato, N. Identification strategy and cataloguing of antigenic cancer epitopes. *Mod. Asp. Immunobiol.*, 1:17-19, 2000.
- 29) Maeda, A., Ohguro, H., Maeda, T., Wada, I., Sato, N., Kuroki, Y. and Nakagawa, T. Aberrant expression of photoreceptor-specific calcium-binding protein (recoverin) in cancer cell lines. *Cancer Res.*, in press.

## 高発がん家系およびその要因となる遺伝子の研究

横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部部長

DNA中の8-ヒドロキシグアニンを修復するOGG1蛋白質は遺伝子多型によってその活性に個体差があり、活性の低いCys326型をホモに持つヒトは肺の扁平上皮がんに対するリスクが他の集団に対して約3倍高いことを明らかにした。抗体を作製して染色体DNAの修復を行なっている核型のOGG1蛋白質を検出した。我が国において胃がんの家族内集積の主要因はE-カドヘリン、p53、DNAミスマッチ修復酵素遺伝子の胚細胞変異ではなく、他の遺伝的要因の存在が示唆された。家族性胃がんの国際的な診断基準を作成した。

### A. 研究目的

本研究の目的は、高発がん家系の遺伝的要因としてDNA修復酵素活性の個体差と発がんリスクとの関連性を追求していくことである。これまでの本研究中でOGG1遺伝子を単離し、遺伝的多型による酵素活性の個人差を見出しているため、今年度は、この多型と肺発がんリスクとの関連性を検討する。また、我が国における胃がん集積家系の特徴およびその要因となる遺伝子を解析して、胃がんの発生に対する遺伝的要因を明らかにし、その結果に基づいて胃発がんリスクを評価する診断方法を確立することである。

### B. 研究方法

今年度は以下の4課題に関して研究を行った。

- 1) 8-ヒドロキシグアニンによって誘発される遺伝子の突然変異を抑制するOGG1遺伝子の遺伝的多型による酵素活性の個体差が肺がんへのリスクを規定する要因になりうるか、症例対象研究法にて検証した。
- 2) OGG1蛋白質に対する抗体を作製し、ヒトのがん細胞、正常細胞における発現状態を蛋白質およびmRNAレベルで検討した。
- 3) 国立がんセンター病院で治療を受けた胃がん患者の病歴から胃がんの家族集積性とその特徴を検討した。家族集積性が認められた胃がん患者のパラフィン包埋組織標本からDNAを抽出し、その要因として、E-カドヘリンあるいはp53の胚細胞変異、遺伝子不安定性があるか、PCR法を用いて検討した。
- 4) 家族性胃がんの国際会議に出席し、家族性胃がんの診断基準及びその支援体制に関するガイドラインを作成した。

### (倫理面への配慮)

症例対象研究は、各被験者に十分な説明を行ない、同意を得ている。胃がんの解析は1995年以前の症例なので匿名化してパラフィン包埋組織標本を用いた。いずれの研究も集団として解析したので個人への結果の通知は行っていない。

### C. 研究結果

1) 我々はこれまでの本研究中で、新規の修復酵素遺伝子OGG1を単離している。そして、昨年の本研究中では、この遺伝子は遺伝的な多型によってSer326型とCys326型があり、その8-ヒドロキシグアニンに対する修復酵素活性はSer326型の方がCys326型より高いことを明らかにした。そこで、今年度は肺がん患者を対象として発がんリスクに関する症例対象研究を行なった。その結果、年齢と喫煙歴を考慮した上で、Cys326型をホモに持つヒトは肺の扁平上皮がんに対するリスクが他の集団に対して約3倍高いことが明らかになった。この結果は、この遺伝子産物の酵素活性が低い人は喫煙によって誘発される遺伝子変異を修復する能力が低いために肺がんになるリスクが高いということを示唆している。

2) OGG1遺伝子の機能を蛋白質レベルで解析するために、OGG1蛋白質に対する抗体を2種類作製し、mRNAの発現と比較解析した。OGG1遺伝子はalternative splicingにより8種類のmRNAを発現していることが知られているが、RT-PCR解析により新たに5種類の転写産物があることを明らかにした。特に、13種類の産物のうち1a型アイソフォームのみが核移行シグナルとDNA結合配列を持ち、染色体DNAの修復に関与していることが示

唆された。さらに、この 1a 型アイソフォームは、OGG1 遺伝子に変異のある肺がん細胞株以外では調べたすべての細胞で同程度発現していることが明らかになった。即ち、OGG1 遺伝子はがん細胞においても正常細胞においても、酸化傷害である 8-ヒドロキシグアニンを修復している主要な酵素であることが示唆された。

3) 胃がん患者 3632 名の病歴を調べ、31 例 (0.9%) に胃がんの家族内集積を認めた。これらの家系では胃がんのみが集積していることが多く、HNPCC や Li-Fraumeni 症候群に合致する症例は全くなかった。病理学的には分化型の腺がんが多く、未分化型の腺がんが集積している家系は検出できなかった。患者検体から DNA が採取できた 13 例の遺伝子解析の結果、1 例に E-カドヘリンの胚細胞変異が、3 例にマイクロサテライトの遺伝子不安定性が検出され、p53 変異は全く検出されなかった。この結果から、我が国における胃がん家族集積の要因はこれらの遺伝子以外にあることが示唆された。

4) 1999 年 6 月に英国のケンブリッジで開催された第 1 回の家族性胃がんの国際会議に出席し、家族性胃がんの国際的な診断基準を作成した。その際に、上記の我々の検討結果が十分に考慮された。即ち、集積している胃がんの組織型により diffuse 型と intestinal 型に分類したこと、胃がん発生頻度の高い国と低い国で異なる診断基準を設けたこと、HNPCC/APC/Li-Fraumeni 症候群等を除くという但し書きを付けたことである。また、本会議に参加した外科医等の臨床研究者を中心にして、E-カドヘリンの胚細胞変異陽性患者に対する胃の予防的摘出手術の適応等についても議論され、患者の支援体制に関するガイドラインも作成された。

#### D. 考察

肺がんに関しては、煙草に代表されるように環境要因が重要視されているが、そのような発がん物質を代謝する酵素活性や DNA 修復酵素活性に個体差があり、その違いによって肺発がん感受性も異なっていることが予測されている。そこで DNA 修復酵素遺伝子に着目し、新規遺伝子の単離、遺伝的多型の探索、多型による活性の差の検討を進めてきた。その結果、OGG1 遺伝子の産物の活性には個体差があり、その差によって肺発がんに対するリスクが異なっていることを見出したのは、本研究の特記すべき成果と考えている。しかし、このような多因子のひとつと考えられるリスクファクターは他の因子も考慮に入れて検討する必要がある。今後は、他の

集団を用いた症例対象研究によりこの結果を確認するとともに、他のリスクファクターを考慮して、肺がんへのリスクが遺伝子多型の解析からどこまで推定できるか明らかにしていきたい。

胃がんの発生に関しては、環境要因の重要性は指摘されているものの、遺伝的な要因に関しては最近までほとんど不明であった。しかし、一昨年、ニュージーランドのマオリ族の胃がん集積家系で E-カドヘリンに胚細胞変異があることが報告されたので、我が国における胃がんの発生に関してどの程度この変異が関与しているかを明らかにすることを試みた。本研究によって我が国の胃がんの発生にも家族集積性があり、遺伝的な要因が関与している可能性が強く示された。しかし、必ずしも diffuse 型胃がんが集積しているわけではなく、E-カドヘリンの胚細胞変異も検出されないことから、この集積には他の遺伝的要因が関与していることが示唆された。今後は他の要因を突き止めるため、さらに多くの家系を集め、連鎖解析を含めた包括的な研究が必要である。また、国際的な診断基準に従って、我が国の胃がん集積状況の特徴や頻度を把握することも必要である。

#### E. 結論

肺がんは常染色体優性に遺伝して発生するような家系は少ないが、発がん物質代謝酵素遺伝子に加えて DNA 修復酵素遺伝子の多型が肺発がんの感受性を規定している可能性がある。我が国における胃がん発生には家族集積性があるが、その遺伝的要因に関しては、既知の遺伝子異常では説明できず、未知の要因を探索する包括的な研究が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tani, M., Shimizu, K., Kawahara, C., Kohno, T., Ishimoto, O., Ikawa, S. and Yokota, J. Mutation and expression of the p51 gene in human lung cancer. *Neoplasia*, 1:71-79, 1999.
- 2) Shinmura, K., Kohno, T., Takahashi, M., Sasaki, A., Ochiai, A., Guilford, P., Hunter, A., Reeve, A. E., Sugimura, H., Yamaguchi, N. and Yokota, J. Familial gastric cancer: clinicopathological characteristics, RER phenotype, and germ-line p53 and E-cadherin mutations. *Carcinogenesis*, 20:1127-1131, 1999.

- 3) Chiba, M., Yokoi, T., Kosaka, Y., Chiba, K., Nakamura, H., Ishizaki, T., Yokota, J., Kinoshita, M., Sato, K., Inaba, M., Aoki, Y., Gonzalez, F. J. and Kamataki, T. Genetic polymorphism of CTP2D6 in Japanese population. *Pharmacogenetics*, 9:601-605, 1999.
- 4) Kohno, T. and Yokota, J. How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis? *Carcinogenesis*, 20:1403-1410, 1999.
- 5) Kodera, T., Kohno, T., Takakura, S., Morishita, K., Hamaguchi, H., Hayashi, Y., Sasaki, T. and Yokota, J. Microsatellite instability in lymphoid leukemia and lymphoma cell lines but not in myeloid leukemia cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, 26:267-269, 1999.
- 6) Sugimura, H., Kohno, T., Wakai, K., Nagura, K., Genka, K., Igarashi, H., Morris, B., Baba, S., Ohno, Y., Gao, C.-M., Li, Z.-Y., Wang, J.-D., Takezaki, T., Tajima, K., Varga, T., Sawaguchi, T., Lum, J. K., Martinson, J. J., Tsugane, S., Iwamasa, T., Shinmura, K. and Yokota, J. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 8:669-674, 1999.
- 7) Miyamoto, M., Umetsu, Y., Akita, H., Sawamura, Y., Yokota, J., Kunitoh, H., Nemoto, N., Sato, K., Ariyoshi, N. and Kamataki, T. CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261:658-660, 1999.
- 8) Kohno, T., Takakura, S., Yamada, T., Okamoto, A., Tanaka, T. and Yokota, J. Alterations of the PPP1R3 gene in human cancer. *Cancer Res.*, 59:4170-4174, 1999.
- 9) Chida, M., Yokoi, T., Fukui, T., Kinoshita, M., Yokota, J. and Kamataki, T. Detection of three genetic polymorphisms in the 5'-flanking region and intron of human CYP1A2 in the Japanese population. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90:899-902, 1999.
- 10) Caldas, C., Carneiro, F., Lynch, H. T., Yokota, J., Wiesner, G. L., Powell, S., Lewis, F. R., Huntsman, D. G., Pharoah, P., Jankowski, J. A., MacLeod, P., Vogelsang, H., Keller, G., Park, K. G. M., Richards, F. M., Maher, E. R., Gayther, S., Oliveira, C., Grehan, N., Wight, D., Seruca, R., Roviello, F., Ponder, B. A. J. and Jackson, C. E. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J. Mol. Genet.*, 36:873-880, 1999.
- 11) Hamada, K., Kohno, T., Takahashi, M., Yamazaki, M., Tashiro, H., Sugawara, C., Ohwada, S., Sekido, Y., Minna, J. and Yokota, J. Two regions of homozygous deletion clusters at chromosome band 9p21 in human lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 27:308-318, 2000.
- 12) Inoue, K., Kohno, T., Takakura, S., Hayashi, Y., Mizoguchi, H. and Yokota, J. Frequent microsatellite instability and BAX mutations in T cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leukemia Res.*, in press, 2000.
- 13) Takakura, S., Kohno, T., Shimizu, K., Ohwada, S., Okamoto, A. and Yokota, J. Somatic mutations and genetic polymorphisms of the PPP1R3 gene in patients with several types of cancers. *Oncogene*, 19:836-840, 2000.
- 14) Shinmura, K., Kohno, T., Takeuchi-Sasaki, M., Maeda, M., Segawa, T., Kamo, T., Sugimura, H. and Yokota, J. Expression of the OGG1-type 1a (nuclear form) protein in cancerous and non-cancerous human cells. *Int. J. Oncol.*, 16:701-707, 2000.

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）  
分担研究報告書

発がん感受性・抵抗性ならびに高発がん家系に関する研究  
分担研究者 吉村公雄 国立がんセンター研究所

研究要旨 家系情報管理支援システムの開発を継続し、HNPC Cの追加登録を行った。昨年度構築された胃癌家族歴データベースを解析し、家族性 diffuse 胃癌と家族性 intestinal 胃癌の頻度を推定した。また、胃癌高発家系の面接調査を行い、43 検体を収集した。さらに、家族性 diffuse 胃癌 1 家系を発見した。

A. 研究目的

がんの家系情報を包括的に収集・登録しデータベース化することによって、我が国の高発がん家系の特徴を把握する。最終的には全国レベルで登録を行うべく、登録体制の整備を進める。また、胃癌高発家系の調査を行い、詳細な家系図と血液検体を得ることによって、胃癌と関連する体質や環境因子を発見する。

B. 研究方法

(1) 家族性腫瘍登録体制の整備

昨年度同様、高発がん家系の詳細な情報を包括的に記録し、管理できるコンピューターシステム Family Help を開発した。希望者に無料で配布し、改良に有益な情報を収集した。

(2) 胃癌の家族集積性についての検討

国立がんセンター中央病院において 1995 年 1 月から 1997 年 12 月までの 3 年間に胃癌の手術を受けた全患者（重複除き 877 名）の診療録から、家族歴、病理組織所見を抽出し、家族性胃癌の頻度を検討した。家族性胃癌の診断には 1999 年に定められた International Gastric Cancer Linkage Consortium (IGCLC) の基準を用いた。

(3) 胃癌高発家系面接調査

国立がんセンター中央病院通院中の胃癌高発家系を対象に、倫理委員会の承認を得て面接調査を行った。

(4) HNPC C の登録

大腸癌研究会の HNPC C 登録・遺伝子解析研究班と共同で、大腸癌研究会の会員施設を対象に年次調査を行い、HNPC C アムステルダム基準に合致する症例の家系図と病歴や遺伝子変異などの情報を収集した。

C. 研究結果

(1) 家族性腫瘍登録体制の整備

Family Help は数施設で現在稼働している。今年度は、利用者からの情報をもとに小改良を行った。

(2) 胃癌の家族集積性についての検討

発端者が胃癌を発生する際、その組織系が家系内近親者の組織系とは独立であるという仮定をおくと、家族性 diffuse 胃癌は全家系の約 3% にみられると予測された。また、家族性 intestinal 胃癌は全家系の約 0.07% 存在すると予測された。

実際には家系内で組織型の相関があると思われる。したがって、家族性胃癌の頻度はこの結果よりも多いと考えられた。

(3) 胃癌高発家系の面接調査

29 家系を調査し、43 検体を収集した。また、家族性 diffuse 胃癌 1 家系が発見された。発端者以外の胃癌患者の組織型が明らかになったのは 1/6 程度に過ぎなかった。組織型不明の原因としては、発端者以外の胃癌患者の情報が曖昧なこと、発端者以外の家系構成員の協力が得られないこ

と、他院の協力が得られないこと、検査が施行されていなかったこと、診療録が破棄されていたことなどであった。

#### (4) HNPCCの登録

今年度も新たな家系が発見され、現在203家系が登録されている。

### D. 考察

#### (1) 家族性腫瘍登録体制の整備

登録の意義として以下のことがあげられる。第1に登録情報は家系調査の際の基本台帳として利用可能である。第2に登録情報をもとに疫学的研究を行うことが可能となる。第3に患者とその家族への支援に用いることができる。

家系情報管理支援ソフトウェアの開発とその普及は、家系登録支援体制を整備する際に、効率的で質の高い登録を可能にするために重要であり、今後も新技術を適宜取り入れて開発を継続的に行っていく必要があると考える。

#### (2) 胃癌の家族集積性についての検討

各種基準による家族性胃癌割合の分析は、今後これらの基準で家系を登録していく際に、調査対象をどの程度まで拡大するか判断基準となる。今回、家族性 intestinal 胃癌を発見するには、広範囲の調査を行う必要があることが明らかとなった。今後、調査拠点を1病院だけでなく、家族会などの組織的協力を得て、高発家系の発見につとめて行く必要がある。

#### (3) 胃癌高発家系の面接調査

今回発見された家族性 diffuse 胃癌に関しては胃癌関連遺伝子の変異が存在する可能性がある。今後も胃癌高発家系の重点的な家系調査を継続的にを行い、遺伝性胃癌の可能性が高い家系については同時に検体を収集・解析して発がん関連遺伝子が発見することを目指すべきである。

しかしながら、今回の面接調査によって、発端者以外の情報を得ることが必ずしも容

易ではないことがわかった。今後は、多くの家系の面接を推進すると同時に、今回の対象家系をコホートとして追跡を長期に行っていく、家系内の新たな胃癌患者発生を捕捉することが意義深いと考える。

#### (4) HNPCCの登録

大腸癌研究会と共同で HNPCC の登録を行うことで、データベースの維持、管理体制が確立し、円滑な運営による HNPCC 全国登録が可能となった。

年々登録家系は増えているものの、登録情報の質は様々である。今後も本調査を継続していく必要があるが、登録情報の質も高めるべく登録支援体制をさらに整備する必要がある。

一方、この登録は全国の119施設が対象となっており、一般臨床医が家族性大腸癌に関心を持つよい機会となっているという側面も重要である。

### E. 結論

#### (1) 家族性腫瘍登録体制の整備

家族性腫瘍の登録体制の整備するためには、それを支援するコンピュータシステムの開発を継続し、普及させていく必要があると思われる。

#### (2) 胃癌の家族集積性についての検討

家族性 diffuse 胃癌は胃癌を発端者とするすべての家系の約3%以上、家族性 intestinal 胃癌は約0.07%以上存在すると予測された。

#### (3) 胃癌高発家系の面接調査

29家系から43検体を収集した。また、家族性 diffuse 胃癌1家系が発見された。

#### (4) HNPCCの登録

今年度も新たな家系が発見され、現在203家系が登録されている。

### F. 研究発表

準備中

### G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金(1999年度がん克服10ヵ年戦略事業)  
「発がん感受性・抵抗性ならびに高発がん家系に関する研究」班

分担研究課題:家族性腫瘍対策のための拠点共同ネットワーク構築 ―がん対策と研究の新しい基盤構築

分担研究者: 宇都宮 譲二: 順心会津名病院院長、兵庫医大名誉教授、先端医学研究所家族性腫瘍研究部門非常勤講師  
(財)癌研究会付属病院家族性腫瘍センター部長

研究要旨:家族性腫瘍研究は発癌機序の解明と遺伝子医療展開の先導役と成り、遺伝子診断のがん予防への有用性が確認された。しかし、その普及には生涯リスクの算定、倫理問題庇護など被験者中心の実行基盤の発達が急務である。本研究課題4年間の助成で多領域連携的研究の場として家族性腫瘍研究会が定着し、UICC シンポ(1997年)で本研究計画の方向性が確認された。本研究事業で立案した計画は兵庫医大で採用され先端医学研究所に家族性腫瘍研部門が設立され関西拠点が発足した。その経験を基に東京拠点「癌研/順心会家族性腫瘍センター」が発足し東西基幹ネットが構築された。倫理ガイドラインが醸成され、その実行者である家族性腫瘍カウンセラー養成のセミナーは全国拠点展開の動機となり、また遺伝医療専門医制度準備協議会にがん領域を代表する委員参加の根拠と成った。遺伝情報管理活用(バイオインフォマティクス)と倫理性・安全性の保障システムの両者を一体にした戦略が具体化し得る見通しを得ることが出来た。

#### A 研究目的:

家族性腫瘍とは遺伝性腫瘍(単一遺伝子性腫瘍)と多因子性腫瘍(易罹患性遺伝的多型性と環境要因の相互作用による腫瘍)の両者を含む。前者の研究は発癌機序を解明し発症前診断を実用化して癌予防の論理的戦略を可能とした。その手法は SNPs 検索の発達でより一般的な後者にも展開され様としている。遺伝子学とともに車の両輪となると患者・家族中心の遺伝子医療基盤整備戦略を立てることが本研究の目的である。

#### B 研究方法

1.家族性腫瘍カウンセラー(CSR)養成セミナーによる地域拠点推進:1)「がんの家族内集積性に関する研究」班(野口班)との協同で第2回セミナーを開催し、其の結果に基づきアンケート調査を行って拠点形成意欲ある施設を選定する。2)「遺伝医療システムの構築と運用に関する研究班」(古山班)に参加し職種制度化を推進して拠点人材を育成する。

2.首都圏拠点の整備:計画の推進のため東京に国立がんセンターに次ぐ拠点を構築する。武藤徹一郎副院長の協力で(財)癌研究会付属病院に新設された家族性腫瘍センター部長に宇都宮が就任し遺伝カウンセリング(CS)と遺伝疫学研究を担当する。支援研究拠点として隣接地(東京都豊島区上池袋 1-38-5,アサマビル 302号)に特定医療法人順心会の支援も得て医療情報研究室「順心会家族性腫瘍研究所」(約16坪)を開設する。そこで①癌研病院の診療録と標本を用いた遺伝子/形質DBの構築、②全国拠点、国立がんセンター、兵庫医大先端医学研究所家族性腫瘍部門(兵医大家族性腫瘍研)、ポリポーシスセンター、駒込病院遺伝性腫瘍計画等と連携して基幹共同ネット構築、③癌遺伝CS研究の場とする。

3.遺伝疫学情報とネットシステム構築:兵庫医大先端医学研家族性腫瘍部門との協同。1)家系管理システム:G D S 社 Progeny の日本語版作成、2)インターネット(IN)会議システム First Class Internet Server (FCIS)の導入。

4.研究基盤の運用トライアル:FAP 癌化学予防介入試験(JFAP)(協同研究者石川秀樹大阪府成人病センター)との協力。

5.国際協同研究体制の確立:UICC Familial Cancer and Prevention Project (UICCF CPP)の推進。

#### C 研究結果

1 拠点調査:CSR 養成セミナーの結果 23 候補施設を選

定し得た。FAP、HNPCC、P-J、乳癌、胃癌 VHL、MEN1、MEN2、家族性膵臓癌、家族性乳癌、等に関し 1148 例(733 家系)が調査対象、602 例(382 家系)CS 対象、836 例(439 家系)で遺伝子解析が行われた事が判明した(表1)。

2.東京拠点活動:1)癌研家族性腫瘍センター相談室:H12、1以降、HNPCC、FAP、家族性胃癌、等10家系のCSと遺伝子診断を実施してプロトコルを作成した。2)癌研家族性腫瘍DBの構築:調査課は1946年以降33万件診療録のデジタル基幹DB、1985年以降例の重複癌DBを所有し、臨床各科は一万件以上の各種臓器別DB等を保有する。病歴の家族歴記載も詳細である。これらを基に家族性腫瘍DBが立案された。3)兵医大家族性腫瘍研との連携:テレビ会議システムでつなぎ twin labo としての機能が付加された。

3.遺伝情報システム:1)日本語化 Progeny を用い150家系の適用し、機能性、安全性に満足し得るレベルに到達したので近く JProgeny2000 として完成する。2)FCIS は頻回のグループ討論(倫理委員会等)に有用で、機密性高く家系情報の移送に適した。

4.CSR 養成:固有のセミナーを持つ家族性腫瘍研究会が「古山班」で結成された臨床遺専門医制度準備協議会に人類遺伝学会、臨床遺伝学会と共に参加し得た。

5.がん予防計画:癌研病院の FAP70 家系を JFAPP 対象に選定中である。

6.倫理研究:(家族性腫瘍研と協力)海外資本の遺伝子診断商法2件に対する対応を行った。

7.UICCF CPP:1)神戸市シンポ1977の Monograph が刊行された。2)第3は H13、.5、2-4 に北京 Dr.Yin Yao)に決定。3)鑑別診断ソフト Familial Cancer Database (FaCD)が Rolf Sijmons と Gerard Burger の発表された。  
<http://facd.uicc.org>

#### D 考察、

わが国のバイオ研究資金投入効果は欧米と比べ著しく劣るといわれる。それは行政の縦割り組織と研究基盤整備の遅延に起因する。本研究事業では厚生、文部両省に加え法人の支援を有機的に活用して後者の推進に目標をおいた。具体的研究対象としては1970年開始したポリポーシスセンター計画を患者・家族支援志向型へと現代化することを目標にして倫理等規制 GL の理論的思考の練磨、その担い手としての癌遺伝 CSR 養成、遺伝子/家系情報の伝達、管理、活用技術の発達(バイオインフォマティクス)、のレベル向上の戦略を立案しチャレンジした。その結果1998年度兵庫医大先端医学研

研究所家族性腫瘍部門が発足、今年度の主要成果として「癌研/順心家族性腫瘍センター」が新しい東京拠点として発足し東西基幹ネットが構築され 23 地域拠点の機軸が出来た。それを用いて遺伝子/形質相関 DB 構築、CSR 研修、癌化学予防計画(JFAPP)、遺伝子診断社会問題対応が始動しつつあることは本戦略研究の成果である。

#### E 結論

今年度、本研究事業の支援で「癌研/順心家族性腫瘍センター」が発足して兵庫医大先端医研家族性腫瘍研究部門との間に東西基幹ネット構築された。家族性腫瘍セミナー開催の結果 23 地域拠点コンソーシアム体制が形成されると共に本領域研究者が臨床遺伝専門医性制度準備協議会参加して遺伝CS要員育成等継続的な制度化の趨勢を育成した。その結果家族性腫瘍遺伝子診断を主力とする癌予防計画実行基盤展開の方向性が明らかになった。

#### F 研究発表

##### 1.論文発表

- 1) Enomoto M, Konishi M, Iwama T, Utsunomiya J, Sugihara K, Miyaki M. The relationship between frequencies of extracolonic manifestations and the position of APC germline mutation in patients with familial adenomatous polyposis Jpn J Clin Oncol. Feb. 2000. in press.
- 2) Li G, Tamura K, Yamamoto Y, Sashio H, Utsunomiya J, Yamamura T, Shimoyama T, Furuyama J: Molecular and clinical study of familial adenomatous polyposis for genetic testing and management. J. Exp. Clin. Cancer Res. (in printing).
- 3) Iwama T and Utsunomiya J, Anticipation phenomenon in FAP, J. Clinical Oncol in press, 2000
- 4) Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T and Mori T, Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis, Oncogene, 18, 3098- 3103, 1999
- 5) Utsunomiya J, Iwama T, Tamura T, Miyagi M; Polyposis and Non-polyposis Past and Present in Japan, A review collection for future, Monograph of Familial Cancer Center, Hyogo College of Medicine, Institute for Advanced Medical Sciences, 1999
- 6) Utsunomiya J, Mulvihill JJ, Weber W: Familial Cancer and Prevention, Molecular epidemiology. A new strategy towards cancer control, Wiley-Liss, New York 1999
- 7) Utsunomiya J: Management of Familial Polyposis Coli, in Utsunomiya J, Weber W, Mulvihill JJ, and Yuasa Y (eds.), Familial Cancer and Prevention, John Wiley and Sons, New York 1999

##### 2.学会発表:

- 1) Utsunomiya J, Iwama T, Takeda Y, Tamura K, Gondo N, Tsunematsu Y, Tamura C, Yokoyama S, Yasutomi Y, Yokota J, Noguchi S: Familial

cancer counseling network :A new version of Polyposis Center system in Japan, Abstract book for 2nd Joint Meeting of Leeds Castle Polyposis Group(LCPG) and International Collaborative Group for Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer(ICG-HNPCC) March I - 6, 1999, Melbourne and Lorne, Australia, 67page

- 2) Miyaki M, Iijima T, Sakai K, Mori T, Koike M, Shitara N, Kuroki T, Tamura K, Utsunomiya J, Iwama T: Germline mutations of Ikb1 gene in J LKB1 Japanese Peutz-Jeghers families. Abstract book for 2nd Joint Meeting of LCPG and ICG-HNPCC, March I - 6, 1999, Melbourne and Lorne, Australia, 78 page
- 3) Watanabe T, Muto T, Utsunomiya J, Miyaki M: Microsatellite instability in colorectal adenoma in HNPCC patients, Abstract book for 2nd Joint Meeting of Leeds Castle Polyposis Group(LCPG) and International Collaborative Group for Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer(ICG-HNPCC) March I - 6, 1999, Melbourne and Lorne, Australia, 32 page
- 4) Utsunomiya J: My way with polyposis for 30 years, The Second Chiba International Symposium for Cancer, The Chiba Prefectural Cancer Center 1999, 10, 5

表1 家族性腫瘍地域拠点23箇所の実績 2000年2月

腫瘍	調査対象		カウンセリング		遺伝子診断	
	例	(家系)	例	(家系)	例	(家系)
FAP	465	322	248	180	182	94
HNPCC	126	117	68	51	71	51
P-J	11	11	4	4	11	6
乳癌	95	83	50	38	51	39
胃癌	109	61	43	27	8	3
VHL	140	67	20	15	225	125
MEN 1	65	28	68	30	176	66
MEN 2	112	36	85	29	108	51
家族性膵癌	9	3	9	3		
卵巣癌	3	3	3	3	2	2
副甲状腺機能亢進症	7	2	4	2	2	2
総計	1142	733	602	382	836	439

表 2 全国登録センターの登録実績

腫瘍	ポリポージスセンター		国立がんセンター		計	
	例	(家系)	例	(家系)	例	(家系)
FAP	1336	852			1336	852
HNPCC	145	123	801	195	1264	318
P-J	192	181			192	181



厚生科学研究費補助金（がん克服戦略事業）  
分担研究報告書

MNNG による胃発がん感受性遺伝子のマッピング

分担研究者 牛島 俊和 国立がんセンター研究所部長

研究要旨 昨年度まで、117 頭の雄 ACI x (ACIxBUF)F<sub>1</sub> backcross ラットを用いた発がん実験と 161 座位についての遺伝子型決定とにより、*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)による胃がん発生を促進する遺伝子をラット 15 番染色体に、胃がん発生を抑制する遺伝子を 4 番及び 3 番染色体に、胃がんの大きさ及び進達度を抑制する遺伝子を 16 番染色体に、マップした。本年度は、これら 4 個の遺伝子の存在領域を狭めるために、新規に、戻し交雑ラット 360 匹を用いて発がん実験を行った。また、4 個の遺伝子それぞれについてコンジェニックラットの作成を行い、一部の系統は N5 世代に到達した。15 番染色体上の候補遺伝子として、endothelin receptor type B 遺伝子、及び、tyrosinase-related protein 2 遺伝子のマップを試みた。

A. 研究目的

ヒト胃がんの発生には遺伝的素因の関与が指摘されているものの、分化型の胃がんの家族内発生に関与する遺伝子は殆ど解明されていない。分化型胃がんの良いモデルとされる *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)による胃発がんに関して、ACI ラットは高感受性、BUF ラットは抵抗性を示す。また、その機序としては、胃粘膜傷害の修復時に、ACI ラットでは過剰な細胞増殖が誘発されることが示唆されている。昨年度まで、胃がんの発生に関与する座位として、ラット 15 番染色体の *D15Rat102* 近傍に *Gastric Cancer Susceptibility Gene 1* (*Gcs1*)、4 番染色体 *Amp* 及び 3 番染色体 *D3Rat55* 近傍に *Gastric Cancer Resistance Gene 1* (*Gcr1*) 及び *Gcr2* を、胃がんの大きさと進達度に関与する座位として、16 番染色体 *D16Rat17* 近傍に *Gcr3*、の合計 4 座位を同定した。

今年度は、新たな発がん実験の実施、コンジェニックラットの作成、候補遺伝子の探索、を行い、胃がん感受性遺伝子自体のクローニングのための材料を準備することを目的とした。

B. 研究方法

雄 ACI x (ACIxBUF)F<sub>1</sub> 戻し交雑ラットは、3 群に分割して生産した。第 1 群では 82 匹の全個体、第 2 群では *Gcr1* または *Gcr2* 近傍で組換えがある個体のみを 196 匹から選抜した 62 匹、第 3 群では 82 匹の全個体、合計 226 匹のラットを用いて発がん実験を行った。8 週齢から 40 週齢まで、83mg/l の MNNG を飲水投与し、80 週齢で屠殺した。

コンジェニックラットの作成のため、各世代の雄について、AP-RDA マーカー 76 個、マイクロサ

テライトマーカー 44 個、毛色遺伝子 3 個のうち適切なものを用いて、遺伝子型を決定した。遺伝子型を決定した雄の中から、目的領域以外は相手の遺伝的背景になるべく置換されている個体を選抜し、次の世代をなるべく多数作成した。

候補遺伝子については、ラットとヒトの比較地図を利用し、4 個の胃がん感受性遺伝子の各座位に相当するヒト染色体領域を検索した。細胞増殖シグナル、胃粘膜の炎症や修復、などに関与すると思われる遺伝子について、イントロンまたはタンパク質翻訳領域の PCR-SSCP 解析により、ACI と BUF 間での多型を検索した。

C. 研究結果

第 1、2 群については発がん実験が終了した。肉眼的には、第 1 群 82 匹中 52 匹に、第 2 群 62 匹中 29 匹に、胃腫瘍を認めた。

コンジェニックラットは、① *Gcs1* をはさむ *D15Mgh4* と *D15Rat29* との間約 25cM の ACI 由来の染色体領域を BUF に導入した BUF.ACI-*Gcs1* (D15-BUF)、② *Gcr1* をはさむ *Spr* と *D4Rat66* との間約 25cM の ACI 由来の染色体領域を BUF に導入した BUF.ACI-*Gcr1a* (D4a)、③ *Gcr1* をはさむ *Cpa* と *Amp* との間約 25cM の ACI 由来の染色体領域を BUF に導入した BUF.ACI-*Gcr1b* (D4b)、④ *Gcr2* をはさむ *D3Mgh9* と *D3Rat49* との間約 10cM の ACI 由来の染色体領域を BUF に導入した BUF.ACI-*Gcr2* (D3)、⑤ *Gcr3* をはさむ *D16Mgh4* と *D16Arb3* との間約 30cM の ACI 由来の染色体領域を BUF に導入した BUF.ACI-*Gcr3* (D16)、⑥ *Gcs1* をはさむ *D15Mgh4* と *D15Rat29* との間約 25cM の BUF 由来の染色体領域を ACI に導入した

ACI.BUF-*Gcs1* (D15-ACI)、の6系統について作成した。D15-BUFはN4、D4aはN4、D4bはN5、D3はN5、D16はN4、D15-ACIはN4まで、到達した。

*Gcs1* 領域に存在し、悪性黒色腫細胞でのアポトーシス誘導や前立腺癌での不活化が知られている endothelin receptor type B 遺伝子について、イントロン4箇所(約5kb)とタンパク質翻訳領域(コドン141-420)について、ACIとBUF間での多型を検索したが、多型は認められなかった。そこで、やはり *Gcs1* の範囲内に存在すると考えられる tyrosinase-related protein 2 遺伝子について、イントロン4箇所(約4kb)について多型を検索したが、現在まで、多型は見いだされていない。

#### D. 考察

昨年までの研究成果により、従来、単一の優性の抵抗性遺伝子によると推定されていた BUF ラットの胃癌抵抗性に、合計4個の遺伝子(抵抗性遺伝子3個、感受性遺伝子1個)が関与していることが判明した。うち3個は、胃がんの発生に、1個は胃がんの進展に関与していた。一見単純に見える胃がん感受性にも、複数の遺伝子が別々のステップに関与することが明確に示され、ヒトの胃癌の家族内集積でも、複数の遺伝子が複雑に関与していることが示唆された。胃粘膜傷害時の細胞増殖反応の違いが以前から発がん感受性の違いの原因として示唆されているが、同定された4個の遺伝子のうちの一部が細胞増殖反応の違いに関与している可能性が考えられる。

本年度は、今後、遺伝子自体のクローニングを行うための準備を進めた。新たに発がん実験を行った226匹について胃がんに関する表現形質の解析を進め、連鎖解析を行うことにより、*Gcr1* 及び *Gcr2* の存在領域を1-2 cM程度まで、*Gcs1* については2 cM程度まで、絞り込む予定である。また、N6まで進め、完成したコンジェニックラットの交配により、各座位の影響力や相互作用の評価が可能となると考えられる。

#### E. 結論

MNNGによる胃癌発生の感受性に関与する遺伝子自体のクローニングを進めるため、戻し交雑ラット360匹を用いた発がん実験を終了した。また、コンジェニックラットの作成をN4またはN5世代まで進めた。

#### F. 研究発表

(論文発表)

1. Hirayama, Y., Ushijima, T., Kuramoto, T., Kitano, M., Sugimura, T. and Nagao, M. Linkage mapping of the rat Msh2 DNA mismatch repair gene on chromosome 6. *Exp. Anim.*, 48, 63-64 (1999).
2. Suzui, M., Ushijima, T., Dashwood, R. H., Yoshimi, N., Sugimura, T., Mori, H. and Nagao, M. Frequent mutations in the rat b-catenin gene (*Ctnnb1*) of ulcerative colitis-associated colon cancer induced by 1-hydroxyanthraquinone and methylazoacetate. *Mol. Carcinog.*, 24, 232-237 (1999).
3. Ushijima, T., Yamamoto, M., Suzui, M., Kuramoto, T., Yoshida, Y., Nomoto, T., Tatematsu, M., Sugimura, T. and Nagao, M. Chromosomal mapping of genes controlling development, histological grade, depth of Invasion and size of rat stomach carcinomas. *Cancer Res.*, 60, 1092-1096 (2000).

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略事業）  
分担研究報告書

発がん物質代謝に関わる酵素の活性と発がん感受性に関する研究  
分担研究者：鎌滝 哲也 北海道大学大学院薬学研究科・教授

**研究要旨** がん原物質の代謝的活性化に関与する CYP2A6 の遺伝的多型多型と肺がんリスクに関連性があるか否かを明らかにするために、我々の開発した遺伝子診断法を用いて日本人においてケース・コントロールスタディを実施した。両者には有意な関連性があり、我々が日本人より見出した CYP2A6 遺伝子全欠損型多型をホモ接合体で有するヒトでは、喫煙に関連する肺がんになり難いことが明らかとなった。

#### A. 研究目的

4-メチルニトロソアミノ-1-(3-ピリジル)-1-ブタノン (NNK)などたばこ煙中のがん原性ニトロソアミン類は、CYP2A6 によって効率的に究極発がん物質へと変換される。従って本酵素活性が遺伝的に欠損しているヒトでは、がん原物質の代謝的活性化が少なく、結果として発がんリスクが低いと予想される。本年度は CYP2A6 の遺伝的多型と肺がんリスクとの関連性を明確にするために、ケース・コントロール研究を実施することを目的とした。

#### B. 研究方法

ケース・コントロールスタディの被験者はすべて日本人とし、喫煙者および非喫煙者の定義は、喫煙者は（喫煙本数/日 x 年数）が 10 以上の者とし、非喫煙者は煙草を全く吸ったことがない者とした。喫煙者の年齢は、 $57.9 \pm 6.9$ （非肺がん患者）、 $57.6 \pm 6.5$ （肺がん患者）、非喫煙者の年齢は、 $61.7 \pm 8.3$ （非肺がん患者）、 $60.0 \pm 10.0$ （肺がん患者）であった。喫煙者では非がん患者で、男性 403 名、女性 37 名であり、肺がん患者では、男性 312 名、女性 51 名であった。一方、非喫煙者では、非肺がん

患者で男性 59 名、女性 102 名であり、肺がん患者では、男性 21 名、女性 128 名であった。なお、採血にあたっては、インフォームドコンセントを行い、研究は採血を行う機関に設置されている倫理委員会、あるいは相当する委員会に承認された上で行った。血液より、常法にしたがってゲノム遺伝子を抽出し、遺伝子増幅の鋳型とした。昨年度新たに開発した PCR-RFLP 法を用いた遺伝子診断法を適用して日本人において典型的な 6 種類の遺伝子型、すなわち、野性型/野性型、野性型/置換型、置換型/置換型、野性型/欠損型、置換型/欠損型および欠損型/欠損型の判別を行った。最初に喫煙者、非喫煙者別に、非肺がん患者と肺がん患者で CYP2A6 の遺伝子型の分布に有意差があるか否か検討した。有意差検定は  $\chi^2$ -検定を用い、 $P < 0.05$  を有意差ありとした。また、 $\chi^2$ -検定で CYP2A6 の遺伝的多型と肺がんリスクに関連性が認められた場合は、関連性の度合いをオッズ比と 95%信頼区間で評価した。次に、肺がんを病理学的所見の異なる小細胞がん、非小細胞がんに分け、さらに後者を扁平上皮がんと非扁平上皮がんに分類し、CYP2A6 の遺伝的多型がどの組織型のがんと関連する

か検討した。また、CYP2A6の遺伝的多型が一日の喫煙本数に及ぼす影響を検討し、分散分析で統計的解析を行った。

### C. 研究結果

喫煙者において肺がん患者(363名)と非肺がん患者(440名)のCYP2A6遺伝子型の分布は有意( $P=0.004$ )に異なっており、CYP2A6の遺伝的多型と肺がんリスクが関連していることが示された。全欠損型多型をホモ接合体で有するヒトの頻度は、肺がん患者(1.6%)で、非肺がん患者(5.5%)に比べて明らかに低かった。オッズ比を算出したところ、野生型アリルをホモ接合体で有するヒトのオッズ比を1.00とした場合、全欠損型多型をホモ接合体で有するヒトでは、0.17と有意(95%信頼区間0.06-0.47)に低下していた。一方、非喫煙者において肺がん患者(149名)と非肺がん患者(161名)のCYP2A6遺伝子型の分布には有意な差は認められなかった( $P=0.452$ )。次に喫煙者の肺がん患者において肺がんを病理学的に分類して解析を行った結果、扁平上皮がん罹患している患者と、非肺がん患者のCYP2A6遺伝子型の分布が、有意( $P=0.029$ )に異なっており、CYP2A6の遺伝的多型と扁平上皮がんのリスクが関連していることが示された。全欠損型多型をホモ接合体で有するヒトの数は、扁平上皮がん86名中一人もいなかった。CYP2A6の遺伝的多型が喫煙本数に及ぼす影響を検討したところ、統計学的に有意差はなかった( $P=0.082$ )が全欠損型多型をホモ接合体で有するヒトでは、1日あたりの本数が半分程度まで低下する傾向が認められた。そこで、喫煙本数による影響を除くため、煙草の箱/日×年が20以上40未満のヒトのみに限って再度解析を行ったところ、条件に合致する検体数では遺伝子型

で統計解析ができなかった。そこで、アリルの分布を解析したところ、肺がん患者と非肺がん患者ではCYP2A6のアリルの分布が有意( $P=0.014$ )に異なっており、全欠損型アリルのオッズ比は0.30と有意(95%信頼区間0.11-0.82)に異なっていた。

### D. 考察

喫煙者においては、CYP2A6遺伝子型の分布が肺がん患者と非肺がん患者間で有意に異なっていたが、非喫煙者においては有意ではなかった。CYP2A6がたばこ煙中のがん原物質の代謝的活性化全体に対する寄与が大きい場合予想通りの結果であったが、今回の非喫煙者は喫煙者に比べて検体数が少なく、男女比も喫煙者群とは異なったことから、今後さらに追試が必要である。組織型については、扁平上皮がんのみならず小細胞肺がんにおいてもそのリスクとCYP2A6遺伝的多型が関連する可能性が考えられた。1日あたりの喫煙本数が全欠損型多型をホモ接合体で有するヒトで低下する傾向は、CYP2A6がニコチンの主要代謝酵素であるため、CYP2A6の発現がない場合、ニコチンの代謝が効率的に行なわれないためと考えられた。喫煙本数を揃えた解析においてもCYP2A6遺伝子型の分布ががん患者と非がん患者で有意に異なることは喫煙本数への影響以外の発がん抑制機構の存在を意味すると考えられた。

### E. 結論

昨年度開発した遺伝子診断法を用いて日本人の肺がん患者と非肺がん患者でケース・コントロールスタディを行なった。喫煙者においてCYP2A6の遺伝的多型と肺がんリスクに有意な関連性があることが明らかとなった。全欠損型変異をホモ接合体